

**Zur Normverteilung
spontaner Strukturveränderungen
menschlicher Chromosomen
in verschiedenen Altersgruppen,
untersucht mit Hilfe
der Interferenzmikroskopie**

1976
—

Helga Spiess
—

AUS DER KINDERPOLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN

DIREKTOR: PROF. DR. H. SPIESS

ZUR NORMVERTEILUNG SPONTANER STRUKTURVERÄNDERUNGEN
MENSCHLICHER CHROMOSOMEN IN VERSCHIEDENEN ALTERSGRUPPEN,
UNTERSUCHT MIT HILFE DER INTERFERENZMIKROSKOPIE .

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktowürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Helga Spiess

aus

München

1976

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der
Universität München

Berichterstatter: Professor Dr.J.-D. Murken

Mitberichterstatter: Professor Dr.H. Spiess

Dekan: Professor Dr.W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 9.März 1976



Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINFÜHRUNG	Seite 1-10
1.1. Geschichtlicher Überblick	Seite 1
1.2. Gonosomale Chromosomenaberrationen	Seite 2
1.3. Autosomale Chromosomenaberrationen	Seite 2-5
1.3.1. Numerische autosomale Aberrationen	
1.3.2. Strukturelle autosomale Aberrationen	
1.3.2.1. Physikalisch induzierte Aberrationen	
1.3.2.2. Chemisch induzierte Aberrationen	
1.3.2.3. Strukturelle Aberration nach Virus- infektionen und Vakzination	
1.3.2.4. Spontane strukturelle Aberrationen	
1.4. Klassifizierung struktureller Chromosomenaberrationen	Seite 5-8
1.5. Bisherige Ergebnisse strukturel- ler Veränderungen	Seite 8-10
1.6. Interferenzmikroskopie	Seite 10
2. EXPERIMENTELLES	Seite 11-14
2.1. Methode der Chromosomenpräparation	Seite 11-12
2.2. Interferenzkontrast-Methode	Seite 13
2.3. Photographische Auswertung	Seite 14

3. ERGEBNISSE	Seite 15-40
3.1. Probandengruppen	Seite 15-16
3.2. Verteilung der Häufigkeit einiger chromosomaler Aberrationen in Ab- hängigkeit von Alter und Geschlecht	Seite 16-23
3.3. Gegenüberstellung interferenzmikro- skopischer und hellfeldmikroskopi- scher Aufnahmen	Seite 24-40
4. DISKUSSION	Seite 41-45
4.1. Vergleich der Interferenzkontrast- und hellfeldmikroskopischen Methode	Seite 41-42
4.2. Häufigkeitsverteilung chromosomaler Aberrationen in Geschlechts- und Altersabhängigkeit	Seite 42-45
5. ZUSAMMENFASSUNG	Seite 46-47
6. LITERATURVERZEICHNIS	Seite 48-60

EINFÜHRUNG

1.1. Geschichtlicher Überblick

1882 entdeckte W.Flemming in Corneaschnitten Kernteilungsfiguren, die in einigen Präparationen "chromatische Elemente" erkennen ließen. Waldeyer schlug dafür 1888 das Wort "Chromosom" als Terminus technicus vor.

Nachdem eine Zählung der Chromosomen durch das Zeissche Apochromatsystem um die Jahrhundertwende möglich gemacht wurde, zählte man 24 menschliche Doppelchromosomen.

1925 gaben De Winiwarter und Painter die Chromosomenzahl mit 48 an. 30 Jahre lang hielt man an dieser Meinung fest.

1952 gelang es Hsu, Makino et al., die Zellmembran der Mitosezellen durch eine hypotone Lösung zu zerstören und die Zellen mit Hilfe der 1936 von Heitz eingeführten Quetschtechnik auszuspreiten und unter dem Mikroskop zu betrachten. Obwohl sie Mitosen mit 46 Chromosomen beobachteten, hielten sie an der Lehrmeinung von 48 Chromosomen fest.

1956 gelang es dann Tjio und Levan, an embryonalem Lungengewebe den Beweis für 46 Chromosomen im menschlichen Chromosomensatz zu erbringen.

1960 legte man in Denver zum erstenmal ein Einteilungsprinzip für die Klassifikation menschlicher Chromosomen fest, das die Länge der Chromosomen und die Lage des Zentromers als Unterscheidungskriterien verwendet. Es erfolgte die Aufteilung in 7 Gruppen von A - G und in die Geschlechtschromosomen X und Y.

Im Laufe der Jahre hat die Humangenetik mit ihren zytogenetischen Methoden immer mehr an Bedeutung gewonnen und wesentliche Fortschritte auf dem Gebiet der klinischen Medizin erzielt.

Die Frage nach Chromosomenveränderungen, die gonosomal, autosomal, numerisch und strukturell bedingt sein können, und ihren

klinischen Folgen trat immer mehr in den Vordergrund.

1.2. Gonosomale Chromosomenaberrationen

Meistens gehen gonosomale Aberrationen auf eine Non-disjunction in der Eizelle zurück. Häufig führen sie zu einer Retardierung der Geschlechtsentwicklung und Intelligenz, während die Lebenserwartung normalerweise nur wenig beeinträchtigt wird.

Ein Beispiel für eine gonosomale numerische Aberration stellt das Ullrich-Turner-Syndrom mit der Chromosomenformel XO dar.

Gonosomale strukturelle Aberrationen treten meist in Verbindung mit numerischen auf. Deletionen der langen wie der kurzen Arme, Ringchromosomen und Isochromosomen sind die häufigsten Veränderungen und lassen sich relativ leicht morphologisch mit den heutigen cytogenetischen Methoden diagnostizieren. Dabei ist es weit aus schwieriger eine objektive Aussage über das relativ kleine Y-Chromosom zu machen.

Eindeutige Korrelationen zwischen gonosomalen strukturellen Aberrationen und klinischen Symptomen wurden bisher nicht nachgewiesen.

1.3. Autosomale Chromosomenaberrationen

1.3.1. Numerische autosomale Chromosomenaberrationen

Autosomale numerische Aberrationen können als Polyploidie oder Aneuploidie auftreten.

Bei Polyploidie ist der haploide Chromosomensatz (n) ganzzahlig vervielfacht ($3n$, $4n$ usw.). Bei der Aneuploidie ist die Zahl des diploiden Chromosomensatzes ($2n$) verändert. Man findet entweder eine Hypodiploidie ($2n - 1$) oder eine Hyperdiploidie ($2n + 1$).

Autosomale numerische Aberrationen treten durch Störungen während der Meiose auf. Als Ursache wird Non-disjunction eines

Chromosompaares während der Reifeteilung angesehen. Diese Aberrationen sind im klinischen Bild meist mit schweren Defekt- und Mißbildungen verbunden, die im Gegensatz zu den gonosomalen Aberrationen kaum eine Überlebenschance bieten.

Nach Bloom (21, 17) und Court Brown (40) stellt die Aneuploidie die häufigste Form der vorkommenden numerischen Aberrationen dar. Im Vergleich zu den hypodiploiden Zellen treten die hyperdiploiden um ein Drittel weniger oft auf. (49)

Die Aberrationsquote bei Aneuploidie liegt zwischen 2 und 6 % (49, 18, 20) und überschreitet selten 7 % (56).

Wichtige klinische Beispiele sind die Trisomien, die durch ein gehäuftes Auftreten hyperdiploider Mitosen in einer Zellkultur charakterisiert sind. Bisher sind nur Trisomien der Gruppe D, E und G bekannt, von denen klinisch die Trisomie 21 im Vordergrund steht.

Autosomale Monosomien sind durch viele hypodiploide Mitosen in einer Zellkultur charakterisiert. Sie sind mit dem Leben nicht vereinbar.

1.3.2. Strukturelle autosomale Chromosomenaberrationen

Nachdem Moorhead et al. (63) eine einfache Methode zur Darstellung von Chromosomen in Blutkulturen peripherer Lymphocyten eingeführt haben, wurde die Untersuchung numerischer und struktureller Aberrationen erleichtert und in größerem Umfang möglich.

1.3.2.1. Die ersten Untersuchungen struktureller Aberrationen erfolgten durch Tough et al. (94) an Patienten, die an Spondylarthritis ankylopoetica erkrankt waren und mit hohen Dosen von Röntgenstrahlen behandelt wurden. Tough et al. (94) fanden strukturelle Aberrationen vom chromatid- und chromosomen Typ.

Weitere Untersuchungen (6, 9, 10, 12, 13, 14, 16, 27, 96, 11) auch über diagnostische Röntgenbestrahlung (5, 16, 37), folg-

ten. Sie ergaben, daß Alpha-, Gamma-, Neutronen- und Röntgenstrahlen signifikante strukturelle Schädigungen der Chromosomen in vitro und in vivo bewirken.

1.3.2.2. Nicht nur physikalische Mutagene, sondern auch eine Reihe chemisch mutagen wirkender Substanzen wurden gefunden.

Chemisch wirkende mutagene Substanzen sind von erheblicher Bedeutung, wenn man die Möglichkeit chromosomaler Strukturveränderungen durch Pharmaka (Theophyllin (81), Antibiotika (57), orale Kontrazeptiva (57), Narkotika (57), LSD (41)) und Umwelteinflüsse bedenkt.

1.3.2.3. Nichols (71, 73, 74, 75), Moorhead (64), Makino (60), Stich (92), Gripenberg (51) und Aula (4) wiesen strukturelle Chromosomenaberrationen (Chromatid-Brüche) bei akuten Virusinfektionen nach. Durch Vakzinationen wurden die gleichen Erscheinungen hervorgerufen (71, 72, 52).

1.3.2.4. Wenn Chromosomenaberrationen durch physikalische oder chemische Wirkungen, durch Virusinfektionen und Vakzinationen entstehen können, dann ist die Frage nach Spontanaberrationen naheliegend.

Daß spontane Chromosomenaberrationen in somatischen Zellen stattfinden, halten Aula und Swanson (4), Brogger (29) und Evans (44) für wahrscheinlich. Auch Lubs (58), Sandberg (88) und Jarvik (55) berichten über spontane Chromosomenaberrationen in somatischen Zellen.

Eindeutige Ergebnisse über spontane strukturelle Aberrationen zu finden ist durch die Schwierigkeit belastet, bei Untersuchungen das Auftreten induzierter Aberrationen auszuschließen. Deswegen ist es nicht erstaunlich, daß bisher veröffentlichte Ergebnisse über Häufigkeit und Art struktureller Aberrationen sehr schwanken.

Ob eindeutige Erkenntnisse über spontane Aberrationen überhaupt möglich sein werden, kann erst endgültig bei

Vorliegen eines größeren Untersuchungsmaterials entschieden werden. Dieses Untersuchungsmaterial sollte nach Bochkov (22, 23), Nielsen (76), Court Brown (39), Bloom (17, 19) und German (48) Aussagen über den Einfluß biologischer Faktoren, wie Alter und Geschlecht, Aussagen über den Aberrationstyp und Vergleiche zwischen in vitro- und in vivo-Ergebnissen erlauben.

1.4. Klassifizierung struktureller Chromosomenaberrationen

Um Ergebnisse struktureller Veränderungen miteinander vergleichen zu können, benötigt man ein allgemein gültiges Schema über die Art der beobachteten Veränderungen.

Nach Bloom (21) und Evans (44) treten Chromosomenschädigungen vom chromosomalen und chromatidalen Typ auf.

Schädigungen vom chromosomalen Typ finden in der G_1 -Phase des Zellzyklus statt und führen zu Veränderungen beider Chromatidschenkel.

Schädigungen vom chromatidalen Typ finden in der S- oder G_2 - Phase statt und äußern sich in der Regel in Veränderungen nur eines Chromatidschenkels.

Bei strukturellen Aberrationen können entweder Umbauvorgänge an einem einzigen Chromosom (Intrachanges) stattfinden oder es erfolgen Austauschvorgänge zwischen Chromosomen (Interchanges). Beispiele für Intrachanges vom chromosomalen Typ sind terminale Deletionen, zentrische und azentrische Ringe, azentrische Fragmente (Minutes) und Inversionen. Beispiele für Interchanges sind reziproke Translokationen, dizentrische oder polizentrische Aberrationen.

Bei Aberrationen vom chromatidalen Typ findet man diese Veränderungen entsprechend an einem Chromatidschenkel. Außer diesen Aberrationstypen gibt es noch Chromatid-Brüche und Chromatid-Gaps.

Der Begriff Chromatid-Gap oder lokale Achromasie wurde von Revell (83) vorgeschlagen(84).

Gaps sind färberische Lücken im Chromosom, bzw. in einem

Chromatidschenkel, die optisch als Substanzverlust ohne Verlust der Kontinuität der Chromatidschenkel erscheinen (47, 21, 10, 44, 29, 32).

Die Aberrationsquote liegt nach Bloom (21) bei 2-4% der ausgewerteten Mitosen. Court Brown (38) findet Werte von 3,8 %, Brogger (29) von 5,6 %. Goodman (49) untersuchte verschiedene Altersgruppen und gibt Werte von 7-15 % an. Obe (80) erhält Werte von 6,8 %. Bloom und Tjio (16) finden Werte, die nur um 1 % liegen.

Ergebnisse aus dem genetischen Laboratorium der Universitätskinderpoliklinik München liegen im Bereich von 1-5% Gaps.

Die meisten Autoren (93, 23, 24, 22, 91, 56) beziehen Gaps nicht in ihre Ergebnisse mit ein, da sie ihnen keine Bedeutung beimessen. Sie glauben, daß keine Schädigung des genetischen Materials zugrundeliegt.

Dagegen betrachten Brogger (29, 32) und Gebhart (47) auf der Basis ihrer Untersuchungsergebnisse Gaps als brauchbaren Indikator mutagener Wirkungen.

Nach Gebhart (47) stellen Gaps den häufigsten durch Strahlen oder chemische Mutagene induzierten Aberrationstyp dar. Gebhart (47) zeigt durch Zeit-Effekt-Untersuchungen, daß man Gaps als Primäreffekte mutagener Einwirkung auffassen kann. Nach seiner Meinung resultiert Gapbildung als spezifische Reaktion der Chromosomen auf äußere Einwirkung. Insgesamt schlußfolgert Gebhart (47) aus seinen Beobachtungen, daß achromatische Läsionen stabil sind und eine ebenso spezifische Reaktion der Chromosomen auf die Einwirkung chemischer Mutagene wie Brüche und Chromosomenumbauten darstellen.

Brogger (29) versucht seit 1971 den Entstehungsmechanismus des Gap aufzuklären. Auf der Basis des Chromosomenmodells von Du Praw (42) meint Brogger (29) bereits 1971, daß Gaps durch eine ungenügende Faltung des Chromosomenstrangs in ein Chromatid der Metaphase entstehen (28, 89). Diese Störung in der Faltung ist entweder auf Veränderungen im DNA-

Molekül (15, 30) oder in den chromosomalen Proteinen (packing proteins) zurückzuführen (29).

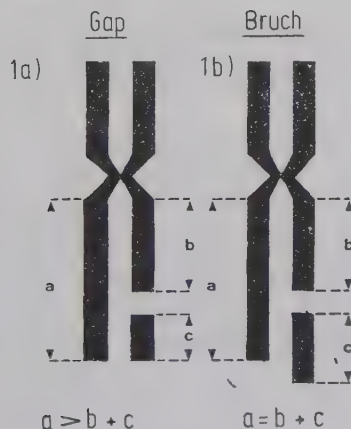
Um den Einfluß von Konformationsänderungen chromosomaler Proteine auf die Gapbildung nachzuprüfen, untersucht Brogger (32) in einer neueren Arbeit 1975 mit Lymphocytenkulturen die Abhängigkeit der Gaphäufigkeit von Thioglykol-Zusätzen.

Er beschreibt eine signifikante Zunahme von Gaps bei Erhöhung der Thioglykolkonzentration im Medium. Die Bruchrate ist dagegen nicht betroffen.

Brogger (32) führt diese Ergebnisse auf die denaturierende Wirkung von Thioglykol auf chromosomale Proteine zurück (Disulfidbrückenspaltung).

Nach Bloom (21) und Evans (44) stellen achromatische Läsionen (Gaps) die häufigste Form chromatidaler Veränderungen dar. Chromatidbrüche folgen in ihrer Häufigkeit und werden in Metaphasen von Leukocytenkulturen in 1-2 % der Mitosen gefunden (21). Nach Gebhart (47) stellen "Brüche echte Diskontinuitäten mit mehr oder weniger deutlicher Dislokation des abgebrochenen Stückes ohne optischen Substanzverlust dar".

Zur Unterscheidung zwischen Gap und Bruch bei chromatidalen Veränderungen möchte ich folgendes Schema von Gebhart (47) wiedergeben.



Schema nach Gebhart (47) : Vergleich von Gap und Bruch

Da in einigen Arbeiten (49, 29, 45) auch sekundäre Constrictions als Aberrationstyp gesondert aufgezählt werden, möchte ich kurz darauf eingehen.

Das Centromer bildet die "primäre Einschnürung". Treten weitere zusammengezogene Regionen oder ganz kleine achromatische Zonen an den Chromatidschenkeln auf, dann spricht man von "sekundären Einschnürungen (45)". Bisher wurde ihnen eine geringere Bedeutung als den Gaps beigemessen.

Brogger (32) vermutet, daß sekundäre "Constrictions" nach demselben Mechanismus wie Gaps entstehen. Er findet sekundäre Konstriktionen in einer Häufigkeit von 4,6 % (29).

1.5. Bisherige Ergebnisse struktureller Veränderungen

Die Häufigkeit von Aberrationen, die durch Alpha-, Beta-, Gamma- oder Röntgenstrahlung induziert werden, liegt im Bereich von 22-52 % (6,34). Sehr niedrige Werte werden von Wiederholt (99) mit 3,8 - 5,6 % angegeben. Unmittelbar nach Bestrahlung wird die höchste Anzahl struktureller Anomalien pro Zelle gefunden (36, 94, 62, 33, 34, 35, 7). Die Veränderungen nehmen mit der Zeit ab, bleiben jedoch über den Kontrollwerten (7). Die Aberrationsquote nach Bestrahlung hängt außerdem von der Kulturzeit ab. Nach Bauchinger (8) besteht zwischen der Aberrationshäufigkeit und der Bestrahlung (α, β, γ) eine lineare quadratische Dosis-Wirkung-Beziehung.

Durch alkylierende Substanzen bedingte strukturelle Chromosomenaberrationen treten nach Bloom (21) in einer Häufigkeit von 12-28 % auf.

Soukup (91) beschreibt die Abhängigkeit der Aberrationsquote von Nitrosamid in Lymphocytenkulturen.

Littlefield (57) findet erhöhte Aberrationsquoten in Lymphocytenkulturen von hormonell behandelten Patienten. Obe (80) zeigt erhöhte Aberrationsquoten bei Alkoholikern. Nach Brogger (31) führt die Behandlung mit dem Antibiotikum Mitomycin ebenfalls zu einer vergrößerten Häufigkeit von chromosomalen Aberrationen.

Daß die Kulturbedingungen die Aberrationsquoten beeinflussen, konnte Bloom (21) nachweisen, indem er PH-Wert, Temperatur und Sauerstoffsättigungsgrad veränderte.

Nach Virusinfektionen wurden strukturelle Aberrationen von 1-79 % beobachtet (69, 51, 3, 52, 43, 59, 100, 98, 25, 26).

Nach Impfungen wurden Aberrationsquoten zwischen 28 und 80 % (52, 90, 70) gefunden. Sametinger (87) und Friedmann (46) finden keine signifikant erhöhte Aberrationsquote nach Gelbfieber- und Rötelnimpfung.

Nur wenige Untersuchungen über spontane strukturelle Chromosomenaberrationen liegen bisher vor.

Hinweise auf Häufigkeiten spontaner Aberrationen lassen sich aus Aberrationsquoten entnehmen, die mit Kontrollgruppen gefunden wurden. Die Schwankungsbreite beobachteter Aberrationsquoten beträgt 0 bis 12,5 % (22, 76, 39, 58).

Bloom (21) gibt als häufigste spontane Aberration Brüche vom chromatidalen Typ an (0,65 %).

Brogger (29) gibt die Gesamtanzahl von Chromosomenschädigungen mit 10,6 % an (4,6 % Constrictions, 5,6 % Gaps und 4,8 % Brüche). Lubs (58) findet geschlechtsunabhängig 4,4 % Gaps und 6,7 % Brüche.

Bochkov (23) untersuchte Probanden verschiedener Altersgruppen. Die Frühgeborenen zeigten mit 10,8 % eine enorm hohe Aberrationsquote, während die Werte für aberrante Zellen der anderen Gruppen in einer Häufigkeit von 1,1 - 1,4 % auftraten. Gaps wurden nicht mitgezählt.

Die mittlere Aberrationsquote aller Altersgruppen beträgt nach Bochkov(22) 1,6 %.

Vergleichende Untersuchungen (23) in vivo und in vitro ergaben in vitro eine Aberrationsquote von 1,31 %. Der entsprechende in vivo-Wert lag bei 0,14 % (23).

Untersuchungen struktureller Aberrationen an Neugeborenen treten in letzter Zeit immer mehr in den Vordergrund (78, 97, 77, 24, 65).

Bochkov (24) stellt bei 2500 Neugeborenen 1,32 % struktu-

relle Veränderungen fest. Chromatidbrüche treten fast doppelt so häufig wie Isochromatidbrüche auf. Die Aberrationsquote von Frühgeborenen beträgt nach Bochkov(24) 7,39 %.

Müller (65) erhält bei Untersuchungen von Kindern verschiedener Altersgruppen (Frühgeborene, Neugeborene und Kinder) eine durchschnittliche Aberrationsquote von 4,75 %.

Kadotani (56) untersuchte Erwachsene von 30-79 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 49 Jahren und gibt als Aberrationsquote ohne Berücksichtigung der Gaps 2,25 % an.

Bei Probanden von 62-92 Jahren zählt Mattevi (61) 10,4 % Aberrationen vom chromatidalen Typ und 1,1 % Aberrationen vom chromosomalen Typ. Riege (86) findet bei 75 bis 100-Jährigen 1,07 % Gaps und 0,049 % Brüche.

Verschiedene Altersgruppen (Neugeborene, 19 bis 21-Jährige und 67 bis 93-Jährige) wurden auch von Goodman (49) untersucht. Bei der Gruppe der Neugeborenen wird die Bruchhäufigkeit mit 2,2 %, die der Gaps mit 8,5 % angegeben (49). Bei der Gruppe der Jugendlichen findet Goodman(49) 5,1 % Brüche und 14,7 % Gaps. Bei der Gruppe der 67 bis 93-Jährigen treten 3,5 % Brüche und 7,8 % Gaps auf (49).

1.6. Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zur Normverteilung spontaner Strukturveränderungen in verschiedenen Altersgruppen darstellen.

Außerdem soll der Versuch unternommen werden, zu zeigen, inwieweit die Interferenzmikroskopie gegenüber der meist benutzten Hellfeldmikroskopie Vorteile zur Differenzierung verschiedener Aberrationstypen wie Gap und Bruch bietet.

2. EXPERIMENTELLES

2.1. Methode der Chromosomenpräparation

Das Verfahren, nach dem in der vorliegenden Arbeit die Chromosomendarstellung aus Leukocyten des peripheren Venenblutes erfolgt, geht auf Murken et al. (66, 67, 68) zurück. Es lehnt sich an die von Moorhead et al. (63) und Arakaki und Sparkes(2) beschriebenen Methoden an.

Das Prinzip der von Moorhead et al. (63) entwickelten Chromosomenpräparation besteht darin, die Erythrozyten des peripheren Venenblutes durch Agglutination mit Hilfe von Phytohämagglutinin (PHA) zu entfernen. PHA regt zugleich Lymphozyten zur Zellteilung an und führt zur Granulozytendegenerierung. Die Anreicherung von Zellen in der Metaphase erfolgt durch das Spindelgift Colchicin.

Das hier eingesetzte Verfahren gliedert sich in die folgenden Schritte:

0,2 ml Blut werden unter möglichst keimarmen Bedingungen aus der Fingerbeere oder Ferse in eine heparinhaltige Blutzuckerpipette aufgenommen und auf 5 ml des Nährmediums 1A der Grand Island Biological Company gegeben.

Dieses Medium enthält Eagles minimal medium, embryonales Kälberserum, PHA, Heparin, Penicillin und Streptomycin. Nach achtundsechzig Stunden Inkubation bei 37° C werden 0,3 ml 1,1 % (w/v) wäßriges Colcemid (Ciba) zugesetzt. Colcemid erreicht eine Endkonzentration von $6 \cdot 10^{-6}$ g/ml in der Suspension.

Nach dreistündiger Inkubation bei 37° C wird die Mischung gerührt, 5 Minuten bei 800 bis 1000 Upm zentrifugiert (Tischzentrifuge). Nach Dekantieren wird der Rückstand zweimal mit warmer (37° C) Hank'scher Lösung, einer sterilen isotoni-schen Kochsalzlösung, gewaschen. Anschließend werden die Zellen

in 1,5 ml warmem destillierten Wasser gequollen. Die erhaltene Suspension wird geschüttelt und 15 Minuten im Brutschrank bei 37° C inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation bei 600 Upm (5 Min.) und Dekantieren wird der Rückstand mindestens zweimal mit je 4 ml fixativ gewaschen. Das Fixativ besteht aus 3 Teilen Methanol und 1 Teil Eisessig. Der Waschvorgang wird so häufig durchgeführt, bis der Rückstand farblos ist.

Anschließend wird der Rückstand, der aus einem Volumen von etwa 4 ml besteht, auf einen gekühlten (4° C) fettfrei gewaschenen Objektträger gegeben.

Der Objektträger wird mehrmals durch die Flamme gezogen und dann 12 bis 20 Stunden an der Luft getrocknet.

Nach Anfärbung der Präparate mit 1:20 verdünnter Giemsa-Lösung erfolgt die Einbettung mit Eukitt (Fa.O.Kindler, Freiburg). Bei der gesamten Chromosomenpräparation sind möglichst sterile Bedingungen einzuhalten.

Alle Präparate wurden mit dem Hellfeldmikroskop (Orthoplan - Fa.Leitz) bei hundertfacher Vergrößerung gemustert.

Die Koordinaten der Mitosen wurden bestimmt und notiert. Erst dann schloß sich eine genauere mikroskopische Untersuchung der einzelnen Mitosen bei 1000-facher Vergrößerung im Hellfeld und mit Hilfe einer Durchlicht-Interferenzkontrasteinrichtung in Ölimmersion an.

Alle gefundenen Veränderungen wurden von einer weiteren Person nochmals kontrolliert.

Neben numerischen Chromosomenaberrationen wurden Gaps und Brüche als Untersuchungsergebnis festgehalten.

2.2. Interferenzkontrast-Methode

Das Orthoplan-Mikroskop der Firma Leitz kann mit einer Durchlicht-Interferenzkontrast-Einrichtung ausgestattet werden. Man kann dann sowohl Hellfeldbeobachtungen durchführen als auch die Interferenzkontrastmethode anwenden.

Die Interferenzkontrastmethode nach Allen, David und Nomarsky (79) beruht auf einer Zweistrahlinterferenz, die im Prinzip in der folgenden Weise zustandekommt:

Durch einen Polarisator linear polarisiertes Licht wird mit Hilfe eines Wollastonprismas in zwei senkrecht zueinander polarisierte Anteile zerlegt. Die beiden Anteile bilden gleiche Winkel gegen die Einfallsrichtung. Sie durchsetzen nach Passieren eines Kondensors das Objekt an verschiedenen Stellen, die einen Abstand voneinander aufweisen, der kleiner als der kleinste auflösbare Abstand zweier Objektpunkte ist.

Aus einer optischen Inhomogenität des Objekts resultieren für die beiden Strahlen unterschiedliche optische Weglängen, sodaß nach Durchlaufen des Objektivs, eines zweiten Wollastonprismas und eines Analysators zwei interferenzfähige Wellenfronten entstehen.

Infolge des differentiellen Gangunterschieds in Richtung der Verschiebung der Teilwellenfronten treten Helligkeitsunterschiede und Farbänderungen in Richtung der differentiellen Aufspaltung auf.

Man arbeitet bei der Interferenzkontrastmethode mit der maximalen Beleuchtungsapertur. Daraus ergeben sich zwei wichtige Konsequenzen:

Man nutzt die maximale Auflösung U des Mikroskops, die mit der Apertur A über $U = A / \lambda$ zusammenhängt. Dabei ist λ die Wellenlänge des verwendeten Lichts.

Außerdem ist infolge der großen Apertur die Tiefenschärfe - im Gegensatz zur Phasenkontrastmikroskopie - klein.

Bei kleiner Tiefenschärfe können morphologische Merkmale des untersuchten Objekts gut erkannt werden.

2.3. Photographische Auswertung

Alle Mitosen mit Brüchen wurden photographiert. Außerdem wurden diejenigen Mitosen photographisch ausgewertet, bei denen Schwierigkeiten bei der Unterscheidung zwischen Gap oder Bruch bestanden oder die numerische Abweichungen von $(n \pm 1)$ aufwiesen. In diesen Fällen wurde immer eine Aufnahme im Hellfeldmikroskop und eine im Interferenz-Kontrastmikroskop hergestellt.

Als Film wurde Agfaortho 25 Professional (schwarz-weiß Kontrast) verwendet.

Die Bilder sind mit der Orthomat - Aufsatzkamera der Firma Leitz bei einer Einstellung von 15 DIN oder 14 DIN und einer durchschnittlichen Belichtungszeit von 6 Minuten bei den Interferenzbildern aufgenommen.

3. ERGEBNISSE

3.1. Probandengruppen

Insgesamt wurden die Chromosomenstrukturen von 87 Probanden untersucht. Diese 87 Probanden sind gleichmäßig fünf Gruppen zuzuordnen. Die dritte Gruppe umfaßt 19 Probanden, alle übrigen Gruppen bestehen aus 17 Probanden.

Die Gruppe der Neugeborenen ist durch die Altersgrenzen von 1 bis 35 Tagen mit einem Durchschnittsalter von 18 Tagen definiert.

Die Gruppe der Säuglinge umfaßt Probanden mit einem Lebensalter von 3 bis 17 Monaten mit einem Durchschnittsalter von 8 Monaten.

Die Gruppe der Kleinkinder besteht aus Probanden mit einem Lebensalter von 3 bis 7 Jahren und einem Durchschnittsalter von 5,6 Jahren.

Die Gruppe der Jugendlichen setzt sich aus Probanden mit einem Lebensalter von 12 bis 17 Jahren und einem Durchschnittsalter von 14,7 Jahren zusammen.

Die Gruppe der Erwachsenen enthält Probanden mit einem Lebensalter von 28 bis 38 Jahren und einem Durchschnittsalter von 29,7 Jahren.

Auf eine gleichmäßige Geschlechtsverteilung wurde kein Wert gelegt.

Bei der Auswahl der Gruppen wurde berücksichtigt, daß Untersuchungen von Probanden im Greisenalter bereits vorliegen (86, 61, 54).

Die Probanden suchten die genetische Sprechstunde der Münchner Universitätskinderpoliklinik zum Ausschluß chromosomaler Erkrankungen oder zur Beratung bei familiär aufgetretenen Chromosomenanomalien auf.

Für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden nur Probanden ausgewählt, bei denen Anzeichen für klinisch-manifeste Chromosomopathien und Virusinfekte fehlten und die zur Zeit der Untersuchung weder mit Röntgenstrahlen noch mit Pharmaka behandelt wurden. Alle ausgewählten Probanden waren klinisch unauffällig.

Mitoseauswahl erfolgte unter mikroskopischer Betrachtung bei schwacher und starker Vergrößerung. Auswahlkriterien waren die Abgrenzung gegenüber benachbarten Mitosen und ausreichende Chromosomenspreitung. Chromosomenzahl, Lage, Art der Defekte und die Koordinaten der Mitose wurden protokolliert. Besondere Aufmerksamkeit galt Gaps und Brüchen. Differenzierung zwischen Gap und Bruch erfolgte nach Gebhart (47).

Die Gesamtzahl der ausgewerteten Mitosen betrug 8 440. Bei 82 Untersuchungspersonen wurden 100 Zellen / Proband gemustert, bei den restlichen 5 Untersuchungspersonen wurden nur 30 bis 50 Zellen / Proband ausgewertet.

3.2. Verteilung der Häufigkeit einiger chromosomaler Aberrationen in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht

Tab.1 faßt noch einmal die ausgewählten Gruppen mit Altersgrenzen, Durchschnittsalter und Zahl der Probanden zusammen. Außerdem ist die Zahl der ausgewerteten Mitosen aufgeführt.

Die Gesamtzahlen der beobachteten Gaps und Brüche sind Tab.2 zu entnehmen. Während bei der Auswertung von 8 440 Mitosen insgesamt nur 19 Brüche gezählt werden, erreicht die Zahl der beobachteten Gaps mit 118 den sechsfachen Wert. Die Häufigkeit von Gaps und Brüchen beträgt zusammen 1,6 %.

Bei der Auswahl der Probandengruppen (Tab.1) wurde vorausgesetzt, daß die Häufigkeit von Gaps und Brüchen geschlechtsunabhängig ist. Die Richtigkeit dieser Voraussetzung erschien aller-

Tab. 1 Anzahl der Probanden und ausgewerteten Mitosen in den verschiedenen Altersgruppen.

Alters- gruppen	Alters- grenzen	Durch- schnitts- alter	Zahl der Pro- banden	Zahl der aus- gewerteten Mitosen
Neu- geborene	1 - 35 Tage	18 Tage	17	1700
Säuglinge	3 - 17 Monate	8 Monate	17	1550
Klein- kinder	3 - 7 Jahre	5,57 Jahre	19	1900
Jugendliche	12 - 17 Jahre	14,7 Jahre	17	1700
Erwachsene	28 - 38 Jahre	29,70 Jahre	17	1590

dings zweifelhaft, als die Aberrationsquoten aller männlichen und weiblichen Probanden unabhängig vom Alter verglichen wurden.
(Tab.3)

Tab. 2 Gesamthäufigkeit von Gaps und Brüchen nach Auswertung der Mitosen aller Probanden unabhängig von Alter und Geschlecht.

Zahl der Probanden	Mitosen	Gaps		Beobachtete Brüche		Aberrationen Gaps und Brüche	
		Zahl	%	Zahl	%	Zahl	%
87	8440	118	1,40	19	0,23	137	1,62

Tab. 3 Häufigkeit von Gaps und Brüchen in Geschlechtsabhängigkeit unabhängig vom Alter.

Geschlecht	Zahl der Probanden	Mitosen	Gaps		Beobachtete Brüche		Aberrationen Gaps-Brüche	
			Zahl	%	Zahl	%	Zahl	%
♂	53	5250	55	1,05	11	0,21	66	1,26
♀	34	2190	63	2,88	8	0,37	71	3,24

Während bei männlichen Probanden eine Aberrationsquote von 1,26 % bestimmt wurde, lag der entsprechende Wert bei den weiblichen Probanden mehr als doppelt so hoch. Es erschien deswegen notwendig, diesen Unterschied auf seine Signifikanz hin zu untersuchen.

Tab. 4 Häufigkeit von Gaps und Brüchen mit den berechneten 95-Prozent-Konfidenzgrenzen.

Probanden- gruppe	Anzahl		Gefundene Aberrationen			
	Probanden	Mitosen	Gap		Brüche	
			Zahl	%	Zahl	%
Neugeborene	♂ 8	800	4	$0,5 \pm 0,49$	--	--
	♀ 9	900	13	$1,44 \pm 0,78$	2	$0,22 \pm 0,30$
Säuglinge	♂ 11	1100	19	$1,73 \pm 0,77$	3	$0,27 \pm 0,30$
	♀ 6	450	6	$1,33 \pm 1,06$	2	$0,44 \pm 0,61$
Kleinkinder	♂ 10	1000	10	$1,0 \pm 0,62$	5	$0,50 \pm 0,43$
	♀ 9	900	15	$1,67 \pm 0,84$	1	$0,11 \pm 0,21$
Jugendliche	♂ 17	1700	14	$0,82 \pm 0,43$	3	$0,18 \pm 0,20$
	♀ --	--	--	--	--	--
Erwachsene	♂ 7	650	8	$1,23 \pm 0,85$	--	--
	♀ 10	940	29	$3,09 \pm 1,1$	3	$0,32 \pm 0,36$

Chromosomale Aberrationen entsprechen nach Evans und O'Riordan (44) Poissonverteilungen. Bei größeren Häufigkeiten werden vermutlich auch Binomialverteilungen realisiert. Bei der Berechnung der 95-Prozent-Konfidenz-Grenzen nach Evans (44) wurde eine Poissonverteilung der beobachteten Aberrationen angenommen. Um signifikante Unterschiede zwischen Aberrationshäufigkeiten feststellen zu können, wurde jeweils die Nullhypothese mit 2x2 -Kontingenztafeln auf einem 5%-Signifikanzniveau im χ^2 -Test geprüft. Die Anwendung dieses Tests auf die Ergebnisse der Tab.3 zeigen, daß sich die Aberrationshäufigkeiten zwischen männlichen und weiblichen Probanden hochsignifikant ($p < 0,01$) unterscheiden.

Tab. 5 Gaphäufigkeit von Probandengruppen verschiedener Altersstufen mit den 95%-Konfidenzgrenzen. Aufeinanderfolgende Gruppen unterscheiden sich signifikant in ihrer Gapquote.

Nr.	Probanden- gruppe	Anzahl		Gap-Häufigkeit	
		Probanden	Mitosen	Zahl	%
1	Neugeborene ♂	8	800	4	0,5 $\pm$ 0,49
2	Neugeborene ♀, Säuglinge (♂♀) und Kleinkinder (♂♀)	45	4350	63	1,45 $\pm$ 0,35
3	Jugendliche Erwachsene ♂	24	2350	22	0,94 $\pm$ 0,39
4	Erwachsene ♀	10	940	29	3,09 $\pm$ 1,1

Nach diesem Resultat wurde die Geschlechtsabhängigkeit der beobachteten Aberrationsquoten in den einzelnen Altersgruppen untersucht. In Tab.4 ist nicht nur das Alter, sondern auch das Geschlecht bei der Aufstellung der Probandengruppen berücksichtigt worden.

Wie bereits die 95-Prozentkonfidenzgrenzen zeigen (Tab.4), besteht keine signifikante Abhängigkeit der Bruchraten von Alter und Geschlecht.

Der χ^2 -Test bestätigt dies auf einem Signifikanzniveau von $p > 0,05$.

Demnach muß die signifikante Geschlechtsabhängigkeit der Aberrationsquote von Gaps und Brüchen (Tab.3) durch signifikante Unterschiede in der Gaphäufigkeit bedingt sein. Der χ^2 -Test ergibt, daß nur in den Altersgruppen der Neugeborenen und Erwachsenen ein signifikanter geschlechtsabhängiger Unterschied der Gapquoten besteht.

Eine weitere schrittweise Anwendung der Nullhypothese zeigt außerdem, daß zwischen weiblichen Neugeborenen, männlichen und weiblichen Säuglingen und Kleinkindern keine signifikanten Unterschiede der Gaphäufigkeit vorhanden sind.

Dagegen ist nicht mit Sicherheit auszuschließen, daß die männlichen Jugendlichen eine geringere Gapquote als die männlichen Kleinkinder aufweisen ($0,1 > p > 0,05$).

Daß man bei weiblichen Erwachsenen eine höhere Gapquote als bei weiblichen Neugeborenen findet, stellt, wie der χ^2 -Test zeigt, ein signifikantes Ergebnis dar.

Die Ergebnisse der statistischen Auswertung von Tab.4 berechtigen, neue Probandengruppen zu definieren.

In Tab.5 sind 4 Gruppen so definiert, daß aufeinander folgende Gruppen sich jeweils signifikant in ihrer Gapquote unterscheiden. Eine solche Aufschlüsselung erleichtert das Verständnis der statistischen Auswertung. Es wird deutlich, daß die Geschlechtsabhängigkeit der Gaphäufigkeit bei den Neugeborenen vermutlich auf eine kleinere Gaphäufigkeit

Tab. 6 Häufigkeit des Auftretens von 2 Gaps pro Mitose
bei der Auswertung von 8 440 Mitosen.

Probanden	Mitosen	A u f t r e t e n v o n 2 G a p s		
		gefundene Zahl	gefundene Häufigkeit %	statistischer Erwartungswert
87	8440	22	$0,26 \pm 0,11$	0,02

der männlichen Probanden und nicht auf eine größere Quote der weiblichen Probanden dieser Altersstufe zurückzuführen ist.

Außerdem ist interessant, daß die Geschlechtsabhängigkeit der Aberrationsquote im Säuglings- und Kleinkindesalter verschwindet und im Erwachsenenalter wieder auftritt (Tab.5).

Es erscheint auch wichtig, festzustellen, daß insgesamt keine signifikante altersabhängige Zunahme der Gapquote in dem untersuchten Altersbereich nachgewiesen werden kann.

Bei der Auswertung der Mitosen konnte beobachtet werden, daß einige Mitosen 2 Gaps aufwiesen. Im Gegensatz dazu wurde nie mehr als ein Bruch / Mitose gefunden. In 22 Mitosen von insgesamt 8440 Mitosen wurden 2 Gaps pro Zelle gefunden. Das entspricht einer Häufigkeit von $0,26 \pm 0,11$ %. Dagegen beträgt der nach dem Produktsatz der Wahrscheinlichkeitsrechnung gefundene statistische Erwartungswert 0,02 % (Tab.6). Dies wird später diskutiert.

Aneuploide Mitosen wurden bei der Auswertung mitgezählt (Tab.7). Hypodiploide Mitosen ($n-1$) wurden in einer Häufigkeit von 4, 75 % beobachtet, hyperdiploide Mitosen ($n + 1$) traten in einer Häufigkeit von 0,37 % auf. Es fällt auf, daß im Säuglings- und Kleinkindesalter hypodiploide Zellen eindeutig am häufigsten auftreten.

Tab.7 Häufigkeit hypodiploider ($n - 1$) und hyperdiploider ($n + 1$) Mitosen in verschiedenen Altersgruppen mit den 95-Prozent-Konfidenzgrenzen.

Altersgruppen	Zahl der Mitosen	Hypodiploidie		Hyperdiploidie	
		Zahl	%	Zahl	%
Neugeborene	1700	27	$1,59 \pm 0,59$	0	0
Säuglinge	1550	112	$7,23 \pm 1,29$	9	$0,58 \pm 0,37$
Kleinkinder	1900	157	$8,26 \pm 1,24$	5	$0,26 \pm 0,22$
Jugendliche	1700	34	$2,0 \pm 0,66$	5	$0,29 \pm 0,26$
Erwachsene	1590	71	$4,47 \pm 1,01$	12	$0,75 \pm 0,42$
Gesamt	8440	401	$4,75 \pm 0,45$	31	$0,37 \pm 0,12$

3.3. Gegenüberstellung interferenzmikroskopischer und hellfeldmikroskopischer Aufnahmen.

Wie in der Einführung bereits erläutert wurde, erweist es sich häufig als schwierig, mit Hilfe der Hellfeldmikroskopie strukturelle Aberrationen eindeutig zu identifizieren. Um herauszufinden, ob die Interferenzmikroskopie die Differenzierung zwischen strukturellen Aberrationen erleichtert, wurden einige hellfeld- und interferenzmikroskopische Aufnahmen der gleichen Mitose einander gegenübergestellt.

Beispiel 1 :

Beim Auszählen der Chromosomen im Hellfeldmikroskop (Abb.1a) erhebt sich die Frage, ob in dieser Mitose die Zahl der Chromosomen 46 oder 47 beträgt, weil nicht entschieden werden kann, ob im Bereich von 6-7 Uhr der Mitose ein oder zwei Chromosomen lokalisiert sind oder ein Isochromatid Bruch vorliegt.

Die interferenzmikroskopische Aufnahme (Abb.1b) schließt einen Isochromatidbruch aus und zeigt, daß in dem genannten Bereich nur ein Chromosom liegt.

Es entsteht außerdem der Verdacht, daß das betreffende Chromosom eine paracentrische Konstriktion oder einen Isochromatid Gap aufweist.

Beispiel 2 :

In der hellfeldmikroskopischen Aufnahme (Abb.2a) fallen die Chromosomen durch verschieden intensive Färbung auf. Im Bereich von 6-7 Uhr der Mitose scheint ein Chromatidbruch vorzuliegen. 45 Chromosomen werden gezählt.

Mit Hilfe der interferenzmikroskopischen Aufnahme (Abb.2b) läßt sich leicht feststellen, daß die Chromosomenzahl 46 beträgt und daß sich in dem bezeichneten Bereich zwei Chromosomen befinden und kein Chromosomenbruch stattgefunden hat. Bei 4 Uhr findet man außerdem ein Satellitenchromosom, das in der hellfeldmikroskopischen Aufnahme (Abb.2a) nicht sichtbar wird.

Beispiel 3

In der hellfeldmikroskopischen Aufnahme (Abb.3a) scheint das ungefähr im Zentrum gelegene Chromosom einen verkürzten rechten Chromatidschenkel zu haben. Außerdem fällt ein schwarzer Punkt oberhalb des Chromatidarms auf, der eine "Minute" oder einen phototechnischen Fehler anzeigen könnte.

Dagegen ist der interferenzmikroskopischen Aufnahme zu entnehmen (Abb.3b), daß der betreffende Chromatidarm eine färbetische Lücke aufweist, also einen Gap enthält.

Außerdem sind in der interferenzmikroskopischen Aufnahme strukturelle Veränderungen zu beobachten, die möglicherweise Brüche repräsentieren.

Beispiel 4

In der hellfeldmikroskopischen Aufnahme (Abb.4a) beobachtet man bei 4 Uhr eine strukturelle Veränderung, die nach der Definition von Gebhart (47) als Gap anzusehen ist. Wegen der Größe des Defektes ist ein Bruch nicht auszuschließen.

Mit Hilfe der interferenzmikroskopischen Aufnahme (Abb.4b) ist diese strukturelle Veränderung eindeutig als Gap zu identifizieren.

Beispiel 5

In der hellfeldmikroskopischen Aufnahme (Abb. 5a) ist bei 2 Uhr der Mitose ein großer Chromatidgap zu erkennen, wenn man die Definition von Gebhart (47) zugrundelegt.

In der interferenzmikroskopischen Aufnahme (Abb. 5b) ist diese Veränderung direkt als Gap identifizierbar. Außerdem wird ein Unterschied in der Länge der beiden Chromatidarme sichtbar, der auf eine Deletion hindeutet.

Beispiel 6

In der hellfeldmikroskopischen Aufnahme (Abb. 6a) ist bei 11 Uhr ein großer Chromatidbruch zu beobachten.

Wie die interferenzmikroskopische Aufnahme (Abb. 6b) zeigt, ist dieser Bruch kleiner als er in der hellfeldmikroskopischen Aufnahme erscheint.

Beispiel 7

In der hellfeldmikroskopischen Aufnahme (Abb. 7a) findet man bei 7 Uhr eine Strukturänderung, die einen Isochromatidgap zeigt.

In der interferenzmikroskopischen Aufnahme (Abb. 7b) ist aus der sichtbar werdenden Dislokation und Diskontinuität der Chromatidstruktur auf einen Isochromatidbruch zu schließen.

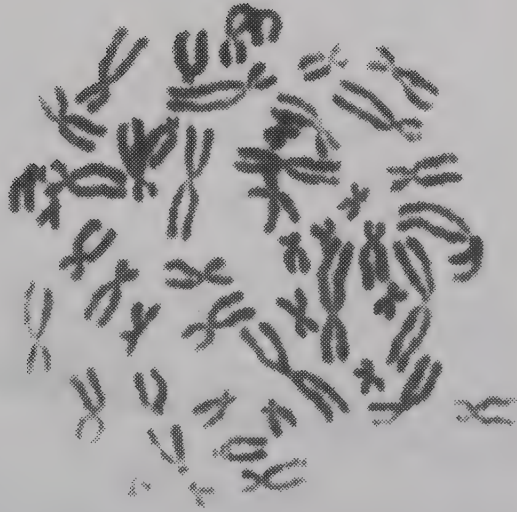


Abb. 1a Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer Mitose
in der Metaphase. Die Mitose entstammt der Lymphocyten-
kultur einer 5-jährigen Probandin. Vergr. 1 : 1000
Siehe Seite 24.

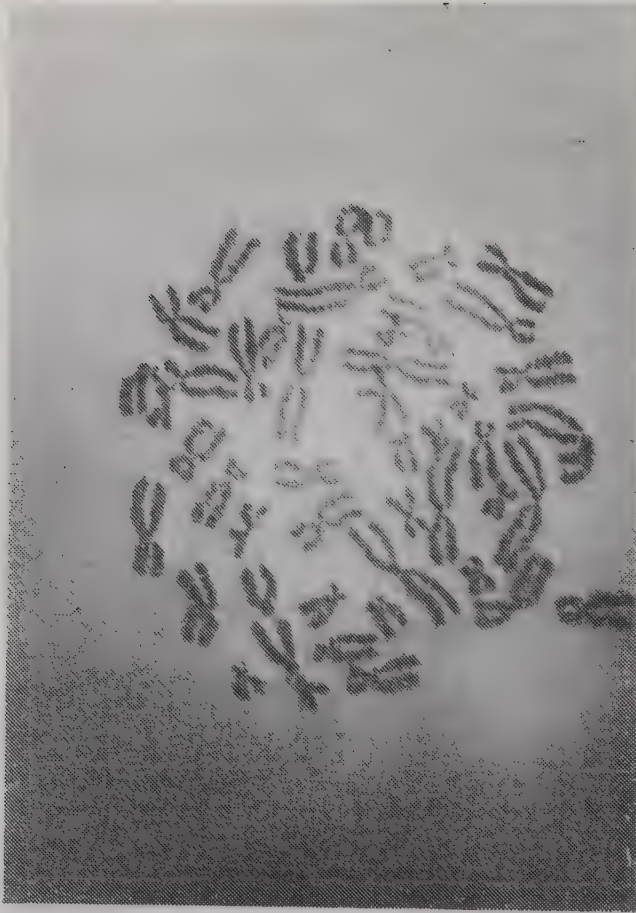


Abb.1b Interferenzmikroskopische Aufnahme derselben Mitose

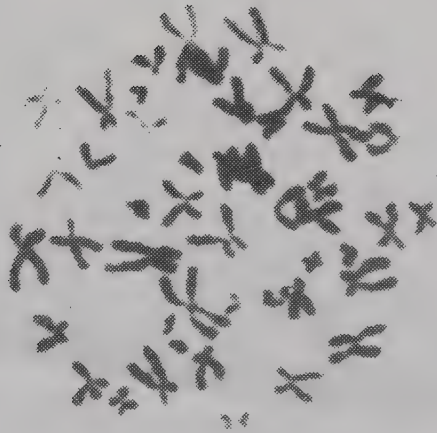


Abb. 2a Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer Mitose in der Metaphase. Die Mitose entstammt der Lymphocytenkultur eines 4 Monate alten Säuglings. Vergr. 1 : 1000
Siehe Seite 24/25.

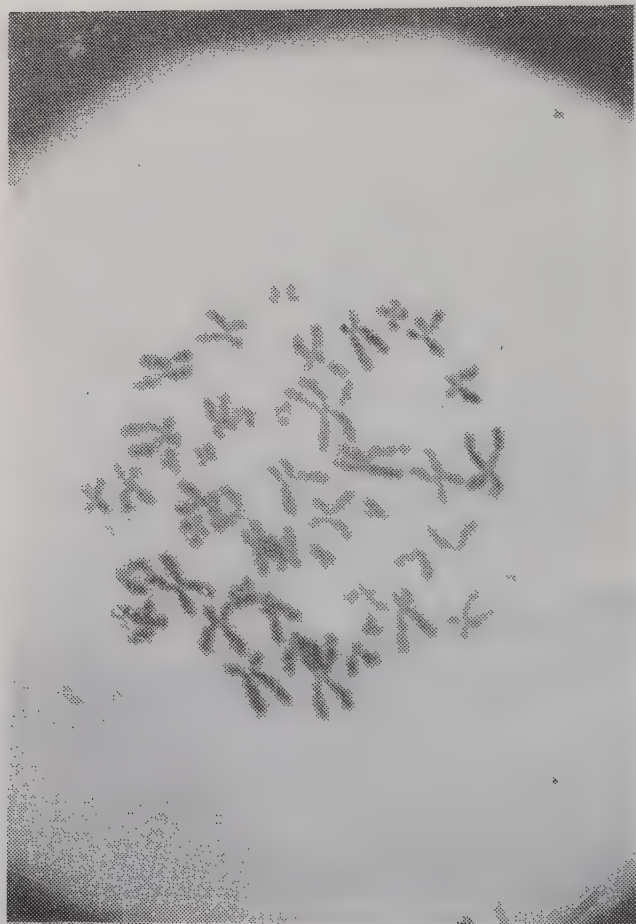


Abb. 2b Interferenzmikroskopische Aufnahme derselben Mitose.

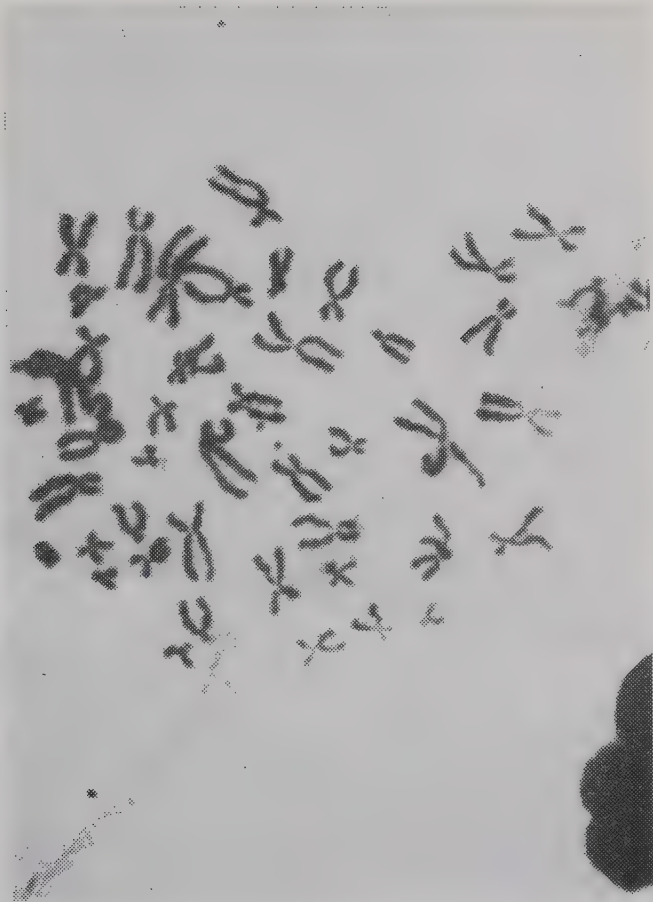


Abb. 3a Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer Mitose in der Metaphase. Die Mitose entstammt der Lymphocytenkultur eines 11 Monate alten Säuglings. Vergr. 1 : 1000. Siehe Seite 25

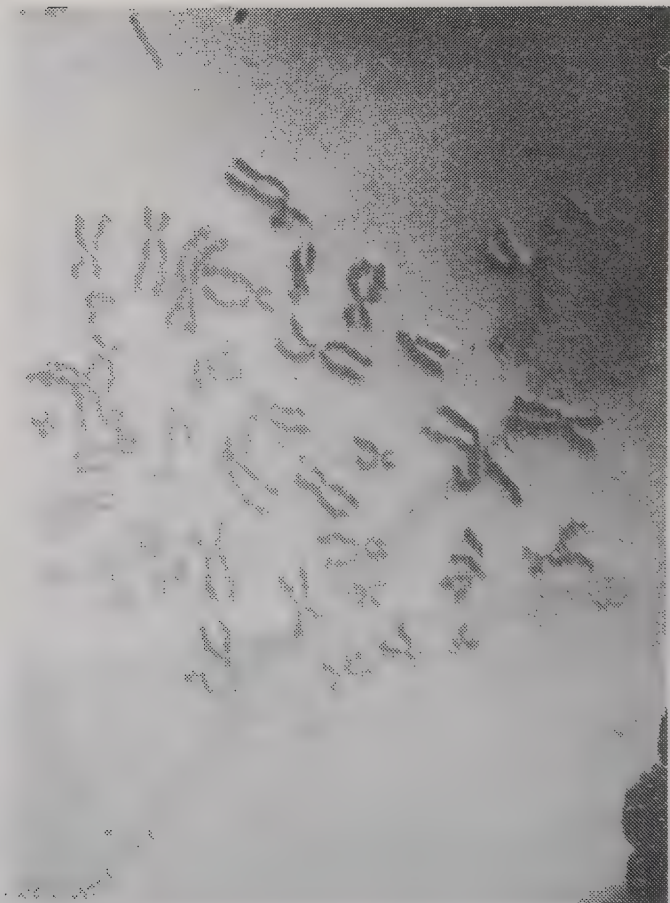


Abb. 3 b Interferenzmikroskopische Aufnahme derselben Mitose.



Abb. 4a. Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer Mitose in der Metaphase. Die Mitose entstammt der Lymphocytenkultur eines 11 Monate alten Säuglings. Vergr. 1 : 1000. Siehe Seite 25.



Abb. 4b . Interferenzmikroskopische Aufnahme derselben Mitose.

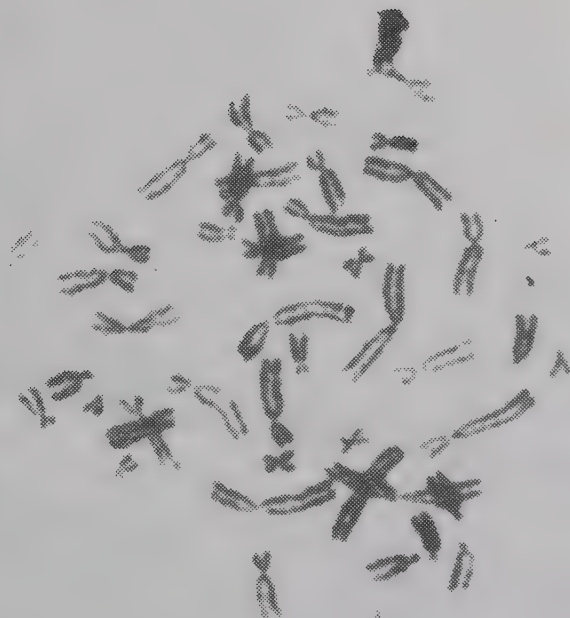


Abb. 5a. Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer Mitose in der Metaphase. Die Mitose entstammt der Lymphocytenkultur eines 4 Monate alten Säuglings. Vergr. 1 : 1000. Siehe Seite 26.



Abb. 5 b. Interferenzmikroskopische Aufnahme derselben Mitose.

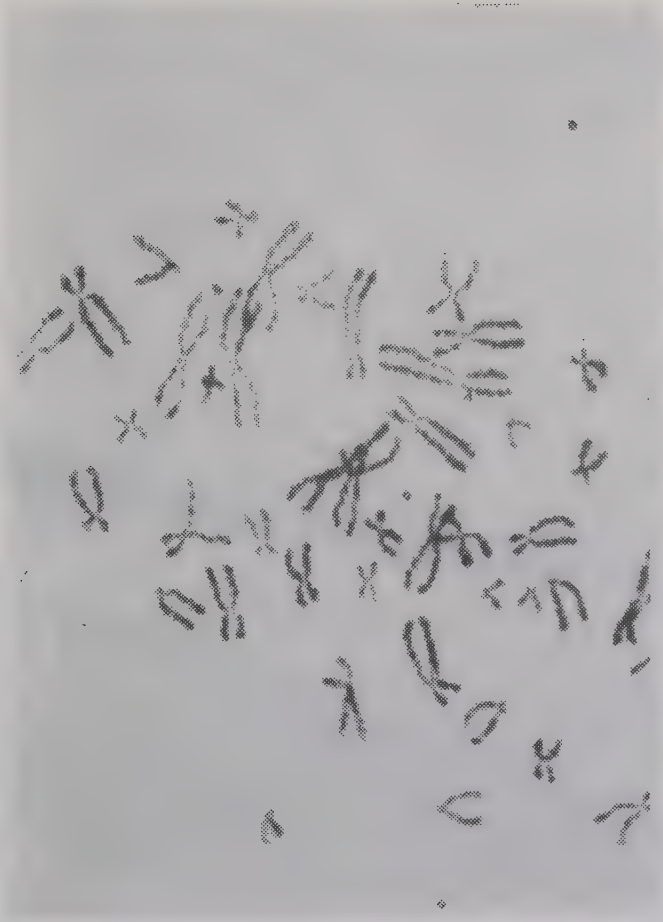


Abb.6a. Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer Mitose in der Metaphase. Die Mitose entstammt der Lymphocytenkultur eines 11 Monate alten Säuglings. Vergr. 1 : 1000. Siehe Seite 26.

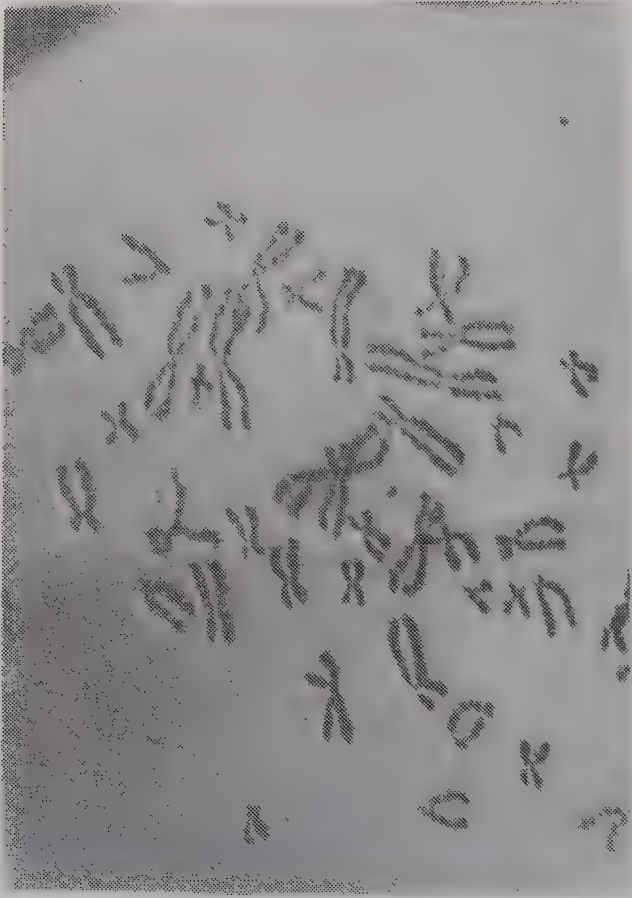


Abb. 6 b. Interferenzmikroskopische Aufnahme derselben Mitose.



Abb. 7 a. Hellfeldmikroskopische Aufnahme einer Mitose in der Metaphase. Die Mitose entstammt der Lymphocytenkultur einer 30-jährigen Probandin. Vergr. 1 : 1000. Siehe Seite 26.

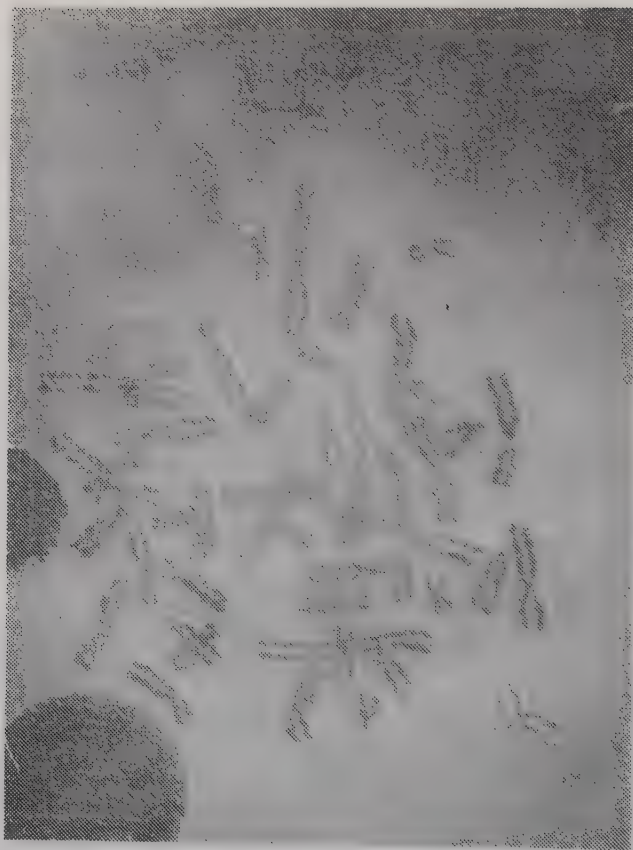


Abb. 7 b. Interferenzmikroskopische Aufnahme derselben Mitose.

4. DISKUSSION

4.1. Vergleich der Interferenzkontrast- und hellfeldmikroskopischen Methode

Strukturunterschiede mikroskopischer Teilchen sind in der Regel mit optischen Inhomogenitäten verbunden. Geringe Differenzen in der optischen Homogenität können mit der Interferenzkontrast-Methode infolge der Interferenz zweier Strahlen, die das Objekt durchsetzen, beobachtet werden. Deswegen eignet sich die Interferenzmikroskopie besonders gut zur Erkennung struktureller Merkmale. Sie ist insofern der Hellfeldmikroskopie überlegen, als bei dieser durch das betrachtete Objekt ein optischer Schnitt gelegt wird, der vertikal zur Objektebene auftretende Strukturänderungen nicht immer erkennen läßt. So überrascht es nicht, daß Revell (85), Vila und Taub (95) mit Hilfe der von Allen, David, Nomarski (79) entwickelten Interferenzkontrast-Methode T- und B- Lymphozyten aufgrund von Strukturmerkmalen unterscheiden konnten .

Daß diese Nomarski-Optik sich auch bei der Differenzierung struktureller chromosomaler Aberrationen gegenüber der Hellfeldmikroskopie als überlegene Methode erweist, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit.

Bei der hellfeldmikroskopischen Betrachtung ist eine größere optische Unterbrechung eines Chromatidarms nach Gebhart (47) als Gap anzusehen, wenn die sichtbaren Chromosomenstücke kürzer als der andere Chromatidarm sind. Dagegen kann man in der interferenzmikroskopischen Aufnahme die Kontinuität des Chromatidarms im Bereich der Läsion erkennen, wie sie bei Vorliegen eines Gaps zu fordern ist. Dadurch ist die Unterscheidung zwischen Bruch und Gap mit dem Interferenzmikroskop erheblich erleichtert. Außerdem werden mit dem Interferenzmikroskop Strukturänderungen sichtbar, die in der hellfeldmikroskopischen Betrachtung nicht

zu beobachten sind. Weil bei der interferenzmikroskopischen Betrachtung strukturelle Aberrationen eindeutiger identifiziert werden können, treten Verwechslungen struktureller und numerischer Veränderungen weniger häufig auf.

4.2. Häufigkeitsverteilung chromosomaler Aberrationen in Geschlechts- und Altersabhängigkeit

Die Gesamtaberrationsquote, die in dieser Arbeit nach Auswertung von 8440 Mitosen gefunden wurde, beträgt 1,6 % und entspricht dem von Bochkov (22) unter vergleichbaren Bedingungen gefundenen Wert.

Insgesamt wurde eine Bruchrate von 0,23 % beobachtet. Dieser Wert ist um mehr als eine Größenordnung kleiner als die entsprechenden Werte, die Court Brown (39), Bochkov (22, 23), Mattevi (61) und Kadotani (56) finden.

In dem untersuchten Altersbereich von Neugeborenen bis 39-jährigen Erwachsenen hängt die Bruchrate weder von Geschlecht noch Alter ab. Dieses Ergebnis entspricht den Beobachtungen von Court Brown (39), Bochkov (22, 23), Mattevi (61), Kadotani (56) und Müller (65).

Überraschend waren dagegen die gefundenen signifikanten Alters- und Geschlechtsabhängigkeiten der Gap-Häufigkeit.

Die bei den Neugeborenen beobachtete Geschlechtsabhängigkeit der Gap-Häufigkeit verschwindet bei den Säuglingen und Kleinkindern und tritt bei Erwachsenen mit der Altersgrenze von 28 bis 38 Jahren wieder auf.

Außerdem zeigen weibliche Probanden im Erwachsenenalter von 28 bis 38 Jahren eine signifikant höhere Gaphäufigkeit als im Neugeborenen-, Säuglings- und Kleinkindesalter. Insofern nimmt also die Gaphäufigkeit bei den weiblichen Probanden altersabhängig zu. Bei den männlichen Probanden ist insgesamt eine altersabhängige Zunahme der Gaphäufigkeit nicht

festzustellen. Man findet allerdings eine vorübergehende Erhöhung der Gapraterate im Säuglings- und Kleinkindesalter.

Möglicherweise ist dieser vorübergehende Anstieg der Gaphäufigkeit darauf zurückzuführen, daß in diesen Altersstufen vermehrt Virusinfektionskrankheiten und Impfungen stattfinden.

Nach Bloom (20,21), Harden (52), Aula (3), Boué (25), Weidert (98), Zoelch (100), Graf (50), Schuler (90) und Nichols (69, 70, 71, 72, 75) führen Virusinfektionen und Impfungen zu erhöhten Aberrationsquoten.

Es liegen nur wenige vergleichbare Untersuchungen über die Verteilung von Gaphäufigkeiten in Abhängigkeit von Geschlecht und Alter vor.

Goodman (49) beobachtete, daß Mitosen weiblicher Probanden im Neugeborenenalter (2-8 Tage) 8,5 %, im College-Alter (19-21 Jahre) 14,7 % und im Greisenalter (67-93 Jahre) 8,4 % Gaps enthalten. Alle Unterschiede sind signifikant ($p < 0,05$) (49).

Wenn auch die absoluten Häufigkeiten, die Goodman (49) findet, um mehr als das Fünffache über den entsprechenden Werten dieser Arbeit liegen, ist der altersabhängige Gang, den er beobachtet, durchaus mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbar.

Daß die absoluten Werte so stark differieren, bestätigt nach Abbatt (1) wahrscheinlich nur die laborspezifischen Schwankungen veröffentlichter Aberrationsquoten.

Es ist zu vermuten, daß die Geschlechtsabhängigkeit der Gaphäufigkeit durch hormonelle Faktoren bedingt ist.

Leider wurde bisher der Einfluß männlicher und weiblicher Geschlechtshormone auf Gaphäufigkeiten in Lymphozyten- oder Fibroblasten-Kulturen nicht untersucht. Der einzige Hinweis, daß hormonelle Faktoren chromosomale Aberrationsquoten beeinflussen, ist Ergebnissen Littlefields (57) zu entnehmen.

Littlefield (57) findet signifikant höhere Bruchraten in Kulturen von Frauen, die schwanger sind oder orale Kontrazeptiva einnehmen, als in Kulturen von entsprechenden Kontrollpersonen.

Es stellt sich die Frage, warum in diesen Untersuchungen Littlefields (57) die Bruchrate geschlechtsabhängig signifikant differiert, während in der vorliegenden Arbeit die Geschlechtsabhängigkeit nur auf die Gaphäufigkeit zu beziehen ist.

Man kann spekulieren, daß bei niedriger Hormonkonzentration nur die Gapbildung betroffen ist, während bei größerer Hormongabe auch mehr Brüche auftreten.

Diese Spekulation wird durch Ergebnisse Gebharts (47) nahegelegt. Gebhart konnte mit Lymphozytenkulturen nachweisen, daß bei einer niedrigen Myleran-Konzentration die Gaprate größer als die Bruchrate ist. Nach Erhöhung der Mylerankonzentration ist dann die Bruchrate höher als die Gaprate.

Gebhart (47) deutet dieses Ergebnis dahingehend, daß Schädigungen, die zu Gaps und Brüchen führen, sich nicht qualitativ, sondern nur quantitativ unterscheiden.

Daß in einer Mitose häufiger 2 Gaps gefunden wurden als nach dem Produktsatz der Wahrscheinlichkeit zu erwarten wäre, entspricht den Beobachtungen Broggers (29, 32).

Dieser Unterschied zwischen gefundenem und erwarteten Wert ist als Hinweis auf den frühen Zeitpunkt der Schädigung im Zellzyklus zu verwerten.

Die Auswertung numerischer Aberrationen zeigt, daß hypodiploide Zellen etwa zehnmal häufiger als hyperdiploide Zellen

beobachtet werden. Dies entspricht den Ergebnissen von Jakobs (53), Jarvik (55), Goodman (49), Mattevi (61) und Bloom (18).

Vermutlich äußert sich in diesem Unterschied die größere pathologische Bedeutung der Hyperdiploidie gegenüber der Hypodiploidie.

Die altersabhängige Verteilung der Hypodiploidie-Häufigkeit wird dahingehend gedeutet, daß ein gleichmäßiger altersbedingter Anstieg von einem vorübergehenden Maximum bei Säuglingen und Kleinkindern unterbrochen wird.

Ob das gehäufte Auftreten hypodiploider Zellen im Säuglings- und Kleinkindesalter ebenfalls auf Virusinfekte und Impfungen zurückgeführt werden kann, bleibt unklar.

Hinweise, daß Virusinfekte und Impfungen die Häufigkeit numerischer Aberrationen erhöhen, sind zur Zeit unbekannt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende Arbeit stellt einen Beitrag zur Normverteilung spontaner Strukturveränderungen menschlicher Chromosomen in verschiedenen Altersgruppen mit Hilfe der Interferenzmikroskopie dar. Im einzelnen wurden die folgenden Ergebnisse erzielt:

1.) Die Interferenzkontrast-Methode erweist sich im Vergleich zur Hellfeldmikroskopie als überlegene Methode zur Differenzierung struktureller chromosomaler Aberrationen. Sie erlaubt eine eindeutige Identifizierung struktureller Merkmale.

2.) Von 87 Untersuchungspersonen verschiedener Altersgruppen (Neugeborene, Säuglinge, Kleinkinder, Jugendliche und Erwachsene von 28 bis 38 Jahren) wurden 8440 Mitosen aus Lymphozytenkulturen ausgewertet.

Die Gesamtaberrationsquote für Gaps und Brüche betrug 1,62 %. 1,40 % Gaps und 0,23 % Brüche wurden insgesamt gefunden.

Aneuploidie trat mit einer Häufigkeit von 5,01 % auf.

3.) Die Bruchrate ist weder alters- noch geschlechtsabhängig.

4.) Dagegen wird eine signifikante Alters- und Geschlechtsabhängigkeit der Gap-Häufigkeit festgestellt.

Die bei Neugeborenen beobachtete Geschlechtsabhängigkeit der Gaphäufigkeit verschwindet bei Säuglingen und Kleinkindern und tritt im Erwachsenenalter wieder auf.

Bei weiblichen Probanden nimmt die Gaprate altersabhängig zu. Bei männlichen Probanden nimmt die Gap-häufigkeit im Säuglings- und Kleinkindesalter signifikant zu und sinkt im jugendlichen Alter auf das Neugeborenniveau, auf dem es auch im Erwachsenenalter bleibt.

- 5.) Hypodiploide Zellen treten häufiger auf (4,75%) als hyperdiploide (0,37 %).

Maximum der altersabhängigen Häufigkeitsverteilung hypodiploider Zellen liegt im Säuglings- und Kleinkindesalter:

- 6.) Zwei Gaps pro Mitose wurden häufiger beobachtet als nach dem Produktsatz der Wahrscheinlichkeit zu erwarten wäre.

Es wird diskutiert, ob die Geschlechtsabhängigkeit der Gap-Häufigkeit auf hormonelle Einflüsse zurückzuführen ist.

Die Zunahme der Gaphäufigkeit und der Hypodiploidie im Säuglings- und Kleinkindesalter wird als Folge von Virusinfekten und Impfungen gedeutet.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. ABBATT, I.D.: International reference study on the identification and scoring of human chromosome aberrations.
Bull.Wld.Hlth Org.50, 373-388 (1974)
2. ARAKAKI, D.T. et al.: Mikrotechnique for culturing leukocytes from whole blood.
Cytogenetics 2, 57 (1963)
3. AULA, P.: Chromosome breaks in leucocytes of chicken-pox patients. Preliminary communication.
Hereditas 49, 451 (1963)
4. AULA, P. : Virus-associated chromosome breakage.
Biologica 89, 78 (1965). Ann.Academ. Scient.Fennical Series A, IV
5. BAUCHINGER, M.: Chromosomenaberrationen und ihre zeitliche Veränderung nach Radium-Röntgentherapie gynäkologischer Tumoren.
Strahlentherapie 135/5, 553-564 (1968)
6. BAUCHINGER, M.: Chromosomenaberrationen in menschlichen peripheren Lymphozyten und Einwirkung von ionisierenden Strahlen und Endoxan.
Habilitationssarbeit, München 1971
7. BAUCHINGER, M. et al.: Chromosome aberrations in human lymphocytes after x-irradiation in vitro II.
Mutat. Research, 20, 107-113 (1973)

8. BAUCHINGER, M.: Chromosome aberrations in human leucocytes after irradiation with 15,0 - MeV neutrons in vitro.
Mut. Research 27, 103-109 (1975)
9. BENDER, M.A. : Somatic chromosome aberrations in normal and irradiated humans.
Rad.Res. 14, 451 (1961)
10. BENDER, M.A.: Aberrations induced in human leukocyte chromosomes by ^3H -labeled Nucleosides.
Cytogenetics I, 65-74 (1962)
11. BENDER, M.A.: Persistant chromosome aberrations in irradiated human subjects.
Rad.Res. 16, 44 (1962)
12. BENDER, M.A.: Persistant aberrations in irradiated human subjects. II
Rad.Res. 18, 389 (1963)
13. BENDER, M.A.: Chromosome aberrations in irradiated human subjects.
Ann. New York Acad. Sci. 114, 249 (1964)
14. BENDER, M.A.: Somatic chromosome aberrations induced by human whole body irradiation.
Rad.Res. 29, 568 (1966)
15. BENDER, M.A. et al.: Mechanisms of chromosomal aberration production.
Mutat.Res. 23, 197-212 (1974)
16. BLOOM, A.D.: In vivo effects of diagnostic X-irradiation on human chromosomes.
New Engl. J. Med. 270, 1341 (1964)

17. BLOOM, A.D.: Cytogenetic investigation of survivors of the atomic bombings of Hiroshima and Nagasaki.
Lancet 2, 672 (1966)
18. BLOOM, A.D.: Variation in the human chromosome number.
Nature 216, 487 (1967)
19. BLOOM, A.D.: Chromosome aberrations in leucocytes of other survivors of the atomic bombings of Hiroshima and Nagasaki.
Lancet 2, 802 (1967)
20. BLOOM, A.D.: Chromosome aberrations among the Yanomama Indians.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S., 66, 920 (1970)
21. BLOOM, A.D.: Induced chromosomal aberrations in man.
Advances in Human Genetics 3, 99 (1972)
22. BOCHKOV, N.P.: The level of spontaneous chromosome aberrations in the culture of human leucocytes.
Genetica 4, 93-98 (1968)
23. BOCHKOV, N.P.: Spontaneous chromosome aberrations in human somatic cells.
Humangenetik 16, 159-164 (1972)
24. BOCHKOV, N.P.: Population Cytogenetic Investigation of Newborns in Moscow.
Humangenetik 22, 139-152 (1974)
25. BOUE, J.G.: Altérations chromosomiques induites par le virus de la rubéole dans les cellules embryonnaires diploïdes humaines cultivées in vitro.
C.R.Acad.Sci., Paris 259, 687 (1964)

26. BOUE, A.: Action du virus de la rubéole sur
différents systèmes de culture de
cellules embryonnaires humaines.
Arch.ges.Virusforsch. 16, 443 (1965)
27. BOYD, J.T. : Chromosome studies on women formerly
employed as luminous-dial painters.
Brit.Med.J. 1, 377 (1966)
28. BRINKLEY, B.R.: Ultrastructural aspects of chromo-
some damage.
Williams and Wilkins, Baltimore
p. 313-345 (1970)
29. BROGGER, A. : Apparently spontaneous chromosome
damage in human leucocytes and the
nature of chromatid gap.
Humangenetik 13, 1-14 (1971)
30. BROGGER, A. : Caffeine-induced enhancement chromo-
some damage in human lymphocytes
treated with methyl-methanesulpho-
nate, mitomycin C and X-rays.
Mutat.Res. 22, 353-360 (1974)
31. BROGGER, A. : Different patterns of chromosome
exchange induced by methyl-methane-
sulphonate and mitomycin C in human
cells.
Hereditas 77, 205-208 (1974)
32. BROGGER, A. : Is the chromatid gap a folding defect
due to protein change? Evidence from
mercaptoethanol treatment of human
lymphocyte chromosomes.
Hereditas 80, 131-136 (1975)

33. BUCKTON, K.E. et al. : A study of chromosome damage persisting after X-ray therapy for ankylosing spondylitis.
Lancet 2, 676-782 (1962)
34. BUCKTON, K.E. et al.: Chromosome investigation on lymphocytes from irradiated patients. Effect of time in culture.
Nature 202, 714-715 (1964)
35. BUCKTON, K.E. et al.: Lymphocyte Survival in man treated with X-rays for ankylosing spondylitis.
Nature 214, 470-473 (1967)
36. CHUDINA, A.P. : Study of radiosensitivity of human chromosomes in normal individuals and Down patients.
Genetica (Moscow) 4 , 99-110 (1968)
37. CONEN, P.E. : Chromosome aberration in infant following use of diagnostic X-rays.
Pediatrics 31, 72 (1963)
38. COURT BROWN, W.M. : Chromosome studies on adults.
Eugenic Laboratory Memoirs Series XLII,
Cambridge Univ. Press, London, p.91 (1966)
39. COURT BROWN, W.M. : Chromosome studies on adults.
Eugenic Laboratory Memoirs (N.Y.)
42 2-91 (1966)
40. COURT BROWN, W.M. : Human population cytogenetics.
North Holland Publishing Co., Amsterdam
p.3 (1967)

41. DISHOTSKY, N.J.: Lipscomb, LSD and genetic damage.
Science, 172, 431 (1971)
42. DU PRAW, E.J.: DNA and Chromosome.
Holt, Rinehart and Winston, New York
(1970)
43. EL-ALFI et al.: Chromosomal breaks in human leuco-
cyte cultures induced by an agent
in the plasma of infections of he-
patitis patients.
Hereditas 52, 285 (1965)
44. EVANS, H.J. et al: Human peripheral blood lymphocytes
for the analysis of chromosome ab-
errations in mutagen tests.
Mut.Res. 31, 135-148 (1975)
45. FERGUSON - SMITH et al.: The sites and relative frequen-
cies of secondary constrictions in
human somatic chromosomes.
Cytogenetics 1, 325-343 (1962)
46. FRIEDMANN, J.: Chromosomenveränderungen bei mit
Gelbfieber-Vaccine geimpften Per-
sonen.
Dissertation aus der Kinderpoli-
klinik München (1970)
47. GEBHART, E. : Experimentelle Beiträge zum Problem
der lokalen Achromasien (Gaps).
Humangenetik 13, 98-107 (1971)
48. GERMAN, J. : Chromosome breakage in a rare and
probably genetically determined
syndrom of man.
Science 148, 506 (1965)

49. GOODMAN, R.M.: Chromosome alterations in three age groups of human females. American Journal of the Medical Science, Vol. 258 (July 1969)
50. GRAF, U.: Chromosomenveränderungen nach Polio-myelitis-Schluckimpfung. Dissertation aus der Kinderpoliklinik München (1970)
51. GRIPENBERG, U.: Chromosome studies in some virus infections. Hereditas 54, 1 (1965)
52. HARDEN, D.G.: Cytogenetic studies on patients with virus infections and subjects vaccinated against yellow fever. Am.J.Hum.Genet. 16, 204 (1964)
53. JACOBS, P.A. et al.: Distribution of human chromosome counts in relation to age. Nature 191, 1178 (1961)
54. JACOBS, P.A. et al.: Cytogenetic studies in leucocytes on the general population subjects of ages, years and more. Ann. of Hum.Genet. 27, 353 (1964)
55. JARVIK, L.F.: Chromosome examinations in aged twins. Amer.J.Hum.Genet. 22, 562-573 (1970)
56. KADOTANI, Tetsuji: Chromosome aberrations in leucocytes of normal human adults from 49 couples. Proc.Japan Acad., 47, 724-727 (1971)

57. LITTLEFIELD, L.G. et al.: Chromosome breakage studies in lymphocytes from normal women, pregnant women, and women taking oral contraceptives.
Am. J.Obstet.Gynecol. 121 (7), 976-980 (April 1st 1975)
58. LUBS, H.A. : Chromosome abnormalities in lymphocytes from normal subjects. A study of 3 700 cells.
Cytogenetics 6, 402-411 (1967)
59. MAKINO, S. : Chromosome aberrations in leukocytes of patients with aseptic meningitis.
Chromosoma 16, 372 (1965)
60. MAKINO, S. et al. : Cytogenetic studies in leucocyte culture from patients with some viral diseases and in those infected with HSU.
Cytologica 33, 370 (1968)
61. MATTEVI, M.S. : Senescence and human chromosome changes.
Humangenetik 27, 1-8 (1975)
62. MILLARD, R.E. : Abnormalities of human chromosomes following therapeutic irradiation.
Cytogenetics 4, 277-294 (1965)
63. MOORHEAD, P.S. : Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood.
Exp. Cell Res. 20, 613 (1960)
64. MOORHEAD, P.S.: Virus effects on host chromosomes in genetic concepts and neoplasia.
M.D. Anderson Hospital and Tumor Institute Williams & Wilkins Co., Baltimore p.281 (1970)

74. NICHOLS, W.W.: Autoradiographic studies on nuclei and chromosomes of cultured Leucocytes after infection with tritium-labeled Adenovirus Type 12.
Virology 34, 301 (1968)
75. NICHOLS, W.W.: Virus induced chromosome abnormalities
Ann.Rev.Microbiol. 24, 479 (1970)
76. NIELSEN, J.: Chromosome abnormalities and psychotropic drugs.
Nature (Lond.) 218, 488-489 (1968)
77. NIELSEN, J.: Incidence of chromosome aberrations among 11 148 newborn children.
Humangenetik 30, 1-12 (1975)
78. NIELSEN, J.: Chromosome examination of newborn children. Purpose and ethical aspects.
Humangenetik 26, 215-222 (1975)
79. NOMARSKI, G. et al.: The Zeiss-Nomarski differential interference equipment for transmitted light microscopy.
Z.wiss.Mikroskopie 69, 193 (1968/1969)
ALLEN, R.D.
80. OBE, Günter : Chromosome Damage in chronic alcohol users.
Humangenetik 29, 191-200 (1975)
81. OSTERTAG, W. : Chemische Mutagenese an menschlichen Zellen in Kultur.
Verlag d.Akademie d.Wissenschaften u.d. Literatur, Mainz 1966
82. PFEIFFER, R.A.: Karyotyp und Phänotyp der autosomalen Chromosomenaberrationen beim Menschen.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1968

83. REVELL, S.H.: A new hypothesis of chromatid changes.
Proc. Radiobiol.Symp., Liège (1954),
Butterworth, London p.243-253 (1955)
84. REVELL, S.H.: Chromatid aberrations - the general
theory.
Columbia Univ. Press, New York, p.41-72
(1963)
85. REVELL, P.A.: Populations of guinea-pig lymphocytes
displayed by Nomarski microscopy.
The Lancet I 394 (Febr.15th 1975)
86. RIEGE, W. : Chromosomenveränderungen bei 75-100
Jährigen.
Dissertationsarbeit, Kinderpoliklinik
München(1970)
87. SAMETINGER, H.: Der Einfluß des Rötelnimpfvirus auf
die Chromosomen menschlicher Leuko-
cyten.
Dissertation aus der Kinderpoliklinik
München (1971)
88. SANDBERG, A.A.: Aneuploidy and age in a population
survey.
Amer.J.Hum.Genet.19, 633-643 (1967)
89. SCHEID, W. et al.: On the nature of achromatic lesions
("Gaps") induced by X-rays in
chromosomes of vicia faba.
Z.Naturforsch.266: 1384-1385 (1971)
90. SCHULER, D. : Einfluß von Pockenviren auf menschl-
iche Chromosomen in vivo und in vitro.
Humangenetik 6, 55

91. SOUKUP Shirley W.: The effect of ethylnitrosourea on chromosome aberrations in vitro et in vivo.
Humangenetik 29, 319-328 (1975)
92. STITCH, H.F.: Viruses and chromosomes.
Prog.Med.Virol. 12, 78 (1970)
93. STOPIK, Dieter: Studie zur intrachromosomalen Bruchverteilung bei menschlichen Leukocyten.
Humangenetik 14, 24-32 (1972)
94. TOUGH, J.M. et al.: X-ray induced chromosome damage in man.
Lancet 2, 849 (1960)
95. VILA, José M.: Nomarski optics and T and B markers.
The Lancet I, 977 (April 26th 1975)
96. VISFELDT, J.: Chromosome aberrations in occupationally exposed personnel in a radiotherapy department, in "Human Radiation Cytogenetics".
North Holland Publishing Co., Amsterdam p.167 (1967)
97. WALZER, S.: Chromosome abnormalities in 11.154 newborn infants.
Americ.J.Hum.Gent. 24, Part I, 38 (1972)
98. WEIDERT, B.: Chromosomenveränderungen bei an Windpocken erkrankten Kindern.
Dissertation aus der Kinderpoliklinik München (1969)
99. WIEDERHOLT, W.: Strahleninduzierte Chromosomenaberrationen nach ²²⁴Ra- Chromosomenanalysen von bestrahlten Morbus Bechterew und Tbc Patienten.
Dissertationsarbeit aus der Kinderpoliklinik der Universität München (1974)

100. ZOELCH, M.:

Chromosomenaberrationen bei an
Masern erkrankten Kindern.
Dissertation aus der Kinderpoli-
klinik München (1968)

Herrn Professor Dr.Jan-Diether Murken danke ich herzlich für die Themenstellung und die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Professor Dr.Heinz Spiess danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Fräulein Brigitte Beyer danke ich besonders für ihre Mithilfe bei der photographischen Auswertung.

LEBENS LAUF

Am 19.6.1942 wurde ich in Okayama (Japan) als Tochter des Philologen Dr.Siegfried Polster und seiner Ehefrau Irene Polster, geb. Dörr, geboren.

Bis 1947 lebte ich mit meinen Eltern in Japan und China. Meine Schulzeit begann ich 1949 im hessischen Grünberg, setzte sie 1951 in München fort und beendete sie 1963 mit dem Abitur am Max-Josef-Stift in München.

Anschließend studierte ich an der Münchener Universität Medizin. Im Frühjahr 1966 bestand ich die ärztliche Vorprüfung. Im Sommer 1969 legte ich die ärztliche Prüfung an der Universität München ab.

Von Januar 1970 bis Frühjahr 1971 leistete ich meine Medizinalassistentenzeit im Kreiskrankenhaus München-Pasing ab.

Nach meiner Approbation im März 1971 begann ich, zuerst mit dem Bayrischen Promotionsstipendium, dann mit dem Graduiertenförderungsstipendium, mit der Promotionsarbeit im genetischen Labor der Universitäts-Kinderpoliklinik.

Vom 1.3.1974 bis 1.4.1975 arbeitete ich in der Anästhesieabteilung der Universität München, Prof.Dr.med.R.Beer.

